

مقایسه پارامترهای اسپرمی و ویژگی‌های عملکردی آن بین افراد بارور و نابارور مبتلا به واریکوسل

فروغ برکت M.Sc.^۱، مرضیه تولایی M.Sc.*^۱، لیلا آزادی M.Sc.^۱، محمد حسین نصرافهانی Ph.D.^۲

۱- پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری تولید مثل، اصفهان، ایران

۲- مرکز باروری و ناباروری اصفهان، اصفهان، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Tavalae.royan@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۵/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۲۸

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه، مقایسه پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک و مورفولوژی)، آسیب DNA، درصد و شدت ROS (Reactive Oxygen Species) و همچنین ارتباط بین این پارامترها، در افراد بارور و نابارور مبتلا به واریکوسل می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه بر روی نمونه مایع منی ۸۳ فرد مبتلا به واریکوسل و ۳۲ فرد بارور می‌باشد. پارامترهای اسپرمی بر اساس معیار سازمان بهداشت جهانی (WHO: World Health Organization)، درصد کمبود پروتامین (رنگ آمیزی کرومایسین A3)، آسیب DNA اسپرم (روش TUNEL)، درصد و شدت ROS (رنگ‌آمیزی H2DCFDA) در افراد بارور و نابارور مبتلا به واریکوسل مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که غلظت، درصد تحرک و مورفولوژی طبیعی اسپرم در افراد مبتلا به واریکوسل نسبت به افراد بارور به‌طور معنی‌داری کمتر است. علاوه بر این، درصد آسیب DNA، کمبود پروتامین و درصد اسپرم های ROS مثبت به‌طور معنی‌داری در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل بالاتر می‌باشد.

نتیجه‌گیری: افزایش استرس اکسیداتیو و دمای بیضه در افراد مبتلا به واریکوسل علاوه بر کاهش کیفیت پارامترهای اسپرمی، بر سلامت کروماتین اسپرم نیز تاثیر منفی داشته و در نتیجه، روند اسپرماتوژنز و میزان باروری را تحت تاثیر قرار می‌دهد.

واژگان کلیدی: واریکوسل، آسیب DNA، پارامترهای اسپرمی، استرس اکسیداتیو

مقدمه

دستگاه تناسلی در مردان مسئول تولید، بلوغ و انتقال اسپرم است که هر گونه ناهنجاری ساختاری و مولکولی در این سیستم موجب ناباروری می شود (۱). یکی از رایج ترین ناهنجاری های ساختاری دستگاه تناسلی که می تواند در روند اسپرماتوزن اختلال ایجاد کند، اتساع و پیچش غیرطبیعی وریدهای طناب اسپرماتیک بیضه است که واریکوسل نامیده می شود (۲). مکانیسم های پاتولوژیکی پیشنهادی برای افراد مبتلا به واریکوسل شامل هیپوکسی بیضه، اتساع وریدها، افزایش دمای بیضه، افزایش استرس اکسیداتیو و غیره می باشد. طبق مطالعات گذشته روند اسپرماتوزن به افزایش دمای بیضه حساس می باشد. با توجه به اینکه در افراد مبتلا به واریکوسل افزایش دما به میزان ۲/۶ درجه سانتی گراد گزارش شده است، لذا این افزایش دما بر روی تکوین اسپرم تاثیر گذاشته و می تواند منجر به تولید اسپرم های نابالغ و احتمالاً با آسیب ساختار کروماتین شود (۳). یکی از رویدادهای مهم در روند اسپرماتوزن جایگزینی هیستون با پروتامین است که نقش مهمی در بسته بندی کروماتین اسپرم ایفا می کند (۴). همچنین یکی از دلایل آسیب DNA اسپرم، ناشی از نقص در بسته بندی کروماتین است که می تواند منجر به آپوپتوزیس ناقص و تولید بیش از حد استرس اکسیداتیو شود (۵).

گونه های فعال اکسیژن (ROS: Reactive Oxygen Species)، از مولکول های اکسیژن مشتق شده اند که در صورت فعالیت بیش از حد، جزء اکسیدانتهای مضر در نظر گرفته می شوند و شامل آنیون سوپراکسید (O_2°)، پرکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال پرکسیل (ROO°)، یون هیپوکلریت (ClO°) و رادیکال بسیار فعال هیدروکسیل (OH°) می باشند (۶).

در شرایط فیزیولوژیک، مقادیر کمی از استرس اکسیداتیو توسط اسپرم تولید می شود که برای ظرفیت یابی، واکنش آکروزومی و نهایتاً لقاح لازم است. اما تولید بیش از حد استرس اکسیداتیو توسط اسپرم و سایر سلول ها مانند لوکوسیت ها می تواند منجر به آسیب DNA، کاهش تحرک و اختلال در سلامت غشای اسپرم شود (۷ و ۸). لکوسیت ها به طور طبیعی در پروستات و سمینال وزیکول وجود دارند و مسئول بخشی از استرس اکسیداتیو ایجاد شده در انزال می باشد. همچنین در افراد مبتلا به واریکوسل، افزایش سلول های التهابی موجود در بیضه مانند سلول های

ماست سل، به عنوان منبع مهم دیگر ایجاد کننده استرس اکسیداتیو در این افراد است (۹).

مطالعات نشان می دهد که اسپرم افراد مبتلا به واریکوسل به دلیل کمبود آنزیم های آنتی اکسیدانتهی در سیتوپلاسم و همچنین وجود اسیدهای چرب غیر اشباع در غشای پلاسمایی در برابر شوک های اکسیداتیو بسیار آسیب پذیر است. بنابراین استرس اکسیداتیو و آسیب DNA ناشی از استرس، از عوامل عمده کاهش کیفیت مایع منی در این افراد است، که در نهایت می تواند موفقیت در باروری را تحت تاثیر قرار دهد (۱۰ و ۱۱). همچنین علاوه بر کاهش کیفیت پارامترهای اسپرمی، افزایش خطر نقص های ژنتیکی در نسل های بعد را به همراه دارد (۱۲). بیشتر مطالعات در افراد مبتلا به واریکوسل، کاهش کیفیت پارامترهای اسپرمی و افزایش آسیب DNA را نشان می دهند. بنابراین، روش های مختلفی جهت درمان واریکوسل استفاده می شود، که در برخی موارد، واریکوسل را به هدف جلوگیری از پیشروی آن درمان می کنند ولی در بیشتر موارد، هدف از درمان واریکوسل افزایش میزان باروری از طریق بهبود عملکرد بیضه و پارامترهای مایع منی می باشد، به طوری که در برخی از مطالعات پس از درمان از طریق عمل جراحی، بهبودی در پارامترهای اسپرمی، کاهش در آسیب DNA و به دنبال آن ایجاد حاملگی در همسران این افراد مشاهده می شود (۱۳ و ۱۴).

با وجود نظریه های متعددی که مکانیسم پاتوژنز واریکوسل بر عملکرد بیضه را بیان می کند، اما هیچ یک نمی تواند به طور قطعی و واضح، اثر واریکوسل را بر روند اسپرماتوزن و باروری مردان بیان کند (۱۵).

هدف از این مطالعه، مقایسه پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک و مورفولوژی)، سلامت DNA و سطح استرس اکسیداتیو بین افراد بارور و نابارور مبتلا به واریکوسل می باشد. همچنین ارتباط بین پارامترهای اسپرمی با درصد آسیب DNA، کمبود پروتامین، درصد و شدت ROS در افراد بارور و نابارور مبتلا به واریکوسل مورد بررسی قرار می گیرد.

مواد و روش ها

انتخاب بیماران: این مطالعه در کمیته اخلاق برای تحقیقات انسانی، در پژوهشکده رویان و مرکز باروری و ناباروری اصفهان به تصویب رسیده است. افراد شرکت کننده در این مطالعه به دو گروه تقسیم شدند، که گروه اول شامل ۸۸ مرد نابارور مبتلا به

Germany) که توسط خیرالهی و همکاران (۱۷) قبلاً توضیح داده شده، بررسی شد که به شرح زیر می‌باشد.

ابتدا مایع منی را توسط محلول بافر فسفات سالین (PBS: Phosphate Buffer Saline) شستشو داده و با تهیه اسمیر بر روی لام، طبق دستورالعمل کیت TUNEL رنگ آمیزی شد. بر اساس این روش رنگ فلئورسنت توسط آنزیم rTdT به انتهای 3DNA-OH (قطعات شکسته DNA) اتصال می‌یابد و fluorescein-12-dUTP، DNA را نشاندار می‌کند. بررسی رنگ سبز فلئورسنت مشاهده شده به وسیله میکروسکپ فلئورسانس با بزرگنمایی ۱۰۰ (BX51; Olympus; Japan) در ناحیه خلفی سر اسپرم، بیانگر TUNEL مثبت (اسپرم‌های دارای آسیب DNA) می‌باشد و رنگ قرمز نشان دهنده اسپرم‌های TUNEL منفی (اسپرم‌های با DNA سالم) می‌باشد که به صورت درصد گزارش می‌شود. برای هر نمونه در حدود ۵۰۰ اسپرم بررسی می‌شود.

کمبود پروتامین با استفاده از رنگ آمیزی کرومایسین A3 (CMA3): درصد کمبود پروتامین اسپرم توسط رنگ آمیزی CMA3 که قبلاً توسط نصر و همکاران (۱۸) بیان شده، مورد بررسی قرار گرفت که به شرح زیر می‌باشد. نمونه مایع منی را در محلول کارنوی (متانول و اسید استیک گلاسیال به نسبت ۱:۳) به مدت ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد فیکس کرده و از آن اسمیر تهیه می‌شود. هر اسلاید توسط ۱۰۰ میکرو لیتر محلول کرومایسین A3 (CMA3, Sigma, USA)، (۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی لیتر بافر مک‌الوین (McIlvain Buffer) که حاوی ۱۰ میلی‌مولار کلرید منیزیم با pH=۷) به مدت ۲۰ دقیقه رنگ آمیزی شده و برای حذف باقیمانده‌ی رنگ اضافی، لام‌ها را در محلول بافر فسفات سالین (PBS) شسته و توسط میکروسکوپ فلئورسانس با بزرگنمایی ۱۰۰× بررسی می‌شود. برای هر نمونه در حدود ۵۰۰ اسپرم بررسی می‌شود. سر اسپرم‌هایی که دارای کمبود پروتامین بوده، زرد درخشان (CMA3 مثبت) که به صورت درصد اسپرم‌های CMA3+ گزارش می‌شود و آن‌هایی که دارای پروتامین طبیعی بوده، رنگ زرد کم رنگ (CMA3 منفی) می‌باشد و به صورت درصد اسپرم‌های CMA3- گزارش می‌شود.

ارزیابی سطح استرس اکسیداتیو: در این مطالعه ارزیابی اسپرم‌های ROS مثبت با استفاده از رنگ (DCFH-2) H2DCFDA، DA: 2', 7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetat,

واریکوسل می‌باشند. معیارهای ورود این افراد به مطالعه، شامل اندازه بیضه طبیعی و واریکوسل بالینی درجه II (در این حالت اتساع وریدهای بیضه قابل لمس است) و درجه III (در این حالت اتساع وریدهای بیضه قابل رؤیت است) می‌باشد. افراد آزواسپرمی، لوکوسیتواسپرمی، دارای سابقه عفونت ادراری، سندرم کلاین فلتر و ناباروری با فاکتور زنانه از مطالعه حذف شدند. گروه دوم شامل ۳۲ فرد بارور (افراد کاندید اهدای جنین یا تعیین جنسیت) می‌باشند که به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته می‌شوند. از افراد شرکت کننده در این مطالعه رضایت نامه کتبی گرفته شد و یک پرسشنامه حاوی اطلاعات شخصی، نوع ناباروری و مدت زمان ناباروری تکمیل گردید.

جمع‌آوری مایع منی: نمونه مایع منی افراد، بعد از ۳ تا ۴ روز پرهیز از مقاربت جمع‌آوری شد. نمونه مایع منی افراد از لحاظ پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک، مورفولوژی) بر اساس معیار سازمان بهداشت جهانی (WHO: World Health Organization) (۲۰۱۰)، کمبود پروتامین (رنگ آمیزی کرومایسین A3)، آسیب DNA (روش TUNEL) و سطح استرس اکسیداتیو (رنگ H2DCFDA) مورد بررسی قرار گرفت.

ارزیابی پارامترهای اسپرم: غلظت نمونه اسپرمی با استفاده از دستگاه شمارش اسپرم (Makler Counting Chamber) بر حسب میلیون بر لیتر و میزان تحرک اسپرم به وسیله نرم افزار CASA (Computer Aided Sperm Analysis)، بر اساس معیار سازمان بهداشت جهانی (۱۶) مورد ارزیابی قرار گرفت. مورفولوژی اسپرم با استفاده از رنگ آمیزی دیف کوئیک (Diff Quik) بررسی شد، که به صورت خلاصه به این ترتیب می‌باشد:

حدود ۲۰ تا ۳۰ میکرولیتر از نمونه رقیق شده را بر روی لام قرار داده و پس از تهیه اسمیر و خشک شدن در دمای اتاق، در سه محلول متانول (جهت تثبیت بر روی لام)، اتوزین (جهت رنگ آمیزی سیتوپلاسم) و Thiazine-like (جهت رنگ آمیزی DNA) به ترتیب به مدت ۳۰ ثانیه قرار می‌گیرد. پس از خشک شدن در دمای اتاق، در هر لام حدود ۲۰۰ اسپرم با استفاده از میکروسکوپ نوری و نرم افزار CASA از لحاظ مورفولوژی بررسی می‌شود.

ارزیابی آسیب DNA با استفاده از روش TUNEL: میزان آسیب DNA با استفاده از روش TUNEL (Apoptosis Detection System Fluorescein, Promega, Mannheim,

Independent- Sample T Test, Coefficient مورد ارزیابی قرار گرفت. $p\text{values} < 0/05$ از لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته می شود.

نتایج

جمعیت مورد بررسی در این مطالعه شامل ۸۳ فرد مبتلا به واریکوسل با درجه II و III و ۳۲ فرد بارور می باشد. جدول ۱ اطلاعات مربوط به پارامترهای توصیفی افراد نابارور مبتلا به واریکوسل و بارور را نشان می دهد. در این مطالعه، میانگین سن افراد مبتلا به واریکوسل $30/7 \pm 0/5$ ، میانگین سن افراد بارور $36/6 \pm 1/08$ و میانگین سن همسران آنها به ترتیب $26/7 \pm 0/5$ و $32/2 \pm 0/18$ سال می باشد. همچنین میانگین مدت زمان ناباروری افراد مبتلا به واریکوسل $2/1 \pm 0/1$ سال است (جدول ۱).

(Sigma Co, USA) و آنالیز با دستگاه فلوسایتومتری انجام شد که این نشان گر، حساسیت بالایی نسبت به H_2O_2 دارد. همان طور که قبلا در مطالعه کیانی و همکاران (۱۹) توضیح داده شده است، رنگ DCFH-DA به طور فعال به سلول وارد شده و با عمل استراز سلولی، گروه های دی استات از هم شکافته شده و ترکیب غیر فلونورسننتی DCFH تشکیل می شود. در حضور پراکسید هیدروژن، DCFH به DCF به اکسید می شود و رنگ فلونورسننت سبز از خود ساطع می کند. این ترکیب قادر به خروج از سلول نیست و با دستگاه فلوسایتومتری قابل ارزیابی است.

آنالیز آماری

آنالیز آماری به وسیله نرم افزار SPSS ۱۸ (SPSS, Chicago, IL, USA) با استفاده از آنالیز Descriptive, Correlation

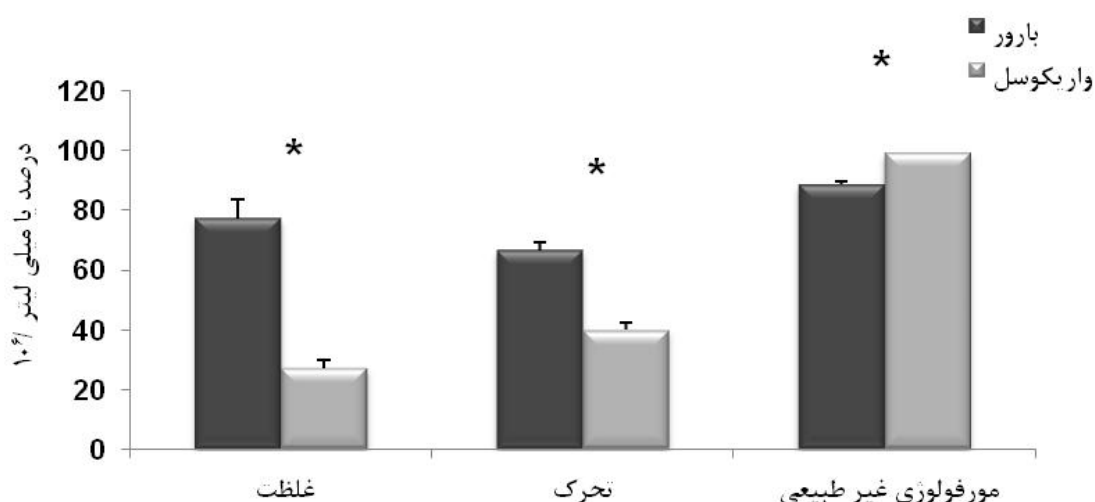
جدول ۱: پارامترهای توصیفی در افراد نابارور واریکوسل و بارور

پارامترها	گروه	حداقل	حداکثر	میانگین \pm خطای استاندارد
غلظت اسپرم (10^6 میلیون / میلی لیتر)	واریکوسل	۰/۲	۱۲۷	$27/1 \pm 2/8$
	بارور	۲۵	۲۰۰	$77/3 \pm 6/2$
درصد تحرک اسپرم	واریکوسل	۰۰	۸۴/۶	$39/9 \pm 2/4$
	بارور	۲۳/۹	۹۴/۴	$66/5 \pm 2/9$
درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم	واریکوسل	۹۸	۱۰۰	$99/2 \pm 0/7$
	بارور	۷۱	۹۷	$88/5 \pm 0/9$
حجم (میلی لیتر)	واریکوسل	۰/۵	۹/۷	$3/4 \pm 0/19$
	بارور	۱/۵	۸/۶	$3/7 \pm 0/28$
سن مرد (سال)	واریکوسل	۲۲	۴۶	$30/7 \pm 0/5$
	بارور	۲۸	۵۵	$36/6 \pm 1/08$
سن خانم (سال)	واریکوسل	۱۷	۴۰	$26/7 \pm 0/5$
	بارور	۲۶	۴۵	$32/2 \pm 0/18$
مدت ازدواج (سال)	واریکوسل	۲	۱۷	$3/8 \pm 0/3$
	بارور	۲	۲۱	$11/4 \pm 0/9$
مدت ناباروری (سال)	واریکوسل	۰/۰۸	۱۷	$2/1 \pm 0/1$

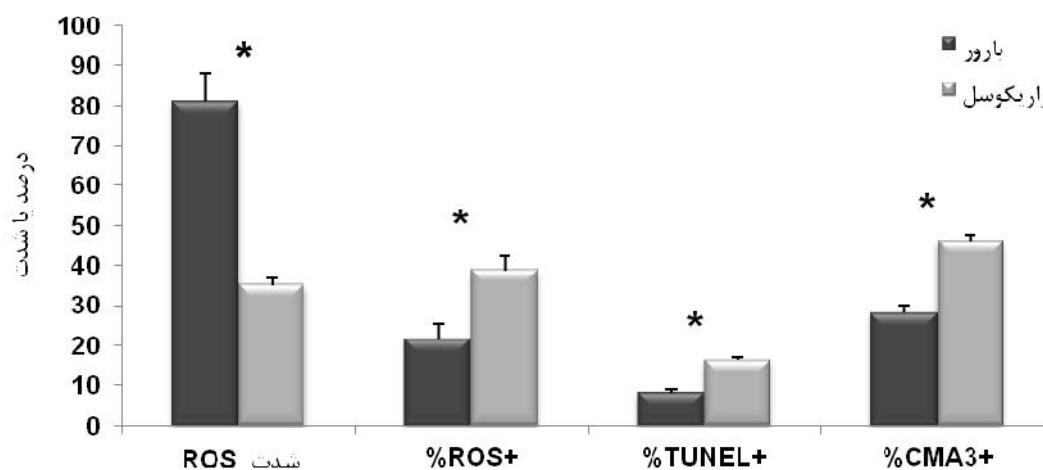
از افراد بارور ($77/3 \pm 6/2$) می باشد ($p < 0/001$). همچنین درصد تحرک اسپرم در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل ($39/9 \pm 2/4$) به طور معنی داری کمتر از افراد بارور ($66/5 \pm 2/9$) است ($p < 0/001$). به علاوه درصد مورفولوژی غیرطبیعی در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل ($99/2 \pm 0/7$) به طور معنی داری بیشتر از افراد بارور ($88/5 \pm 0/9$) می باشد ($p < 0/001$).

مقایسه پارامترهای اسپرمی در افراد بارور و نابارور واریکوسل

نمودار ۱ میانگین پارامترهای اسپرمی شامل غلظت، درصد تحرک و درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم را در افراد بارور و نابارور مبتلا به واریکوسل نشان می دهد. غلظت اسپرم در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل ($27/1 \pm 2/8$) به طور معنی داری کمتر



نمودار ۱: مقایسه پارامترهای اسپرم بین افراد بارور و نابارور واریکوسل (میانگین \pm انحراف معیار، $p < 0.05$)



نمودار ۲: مقایسه شدت و درصد اسپرم های CMA3 مثبت و TUNEL مثبت بین افراد بارور و نابارور واریکوسل (میانگین \pm انحراف معیار، $p < 0.05$)

به ترتیب $28/1 \pm 1/9$ و $46/07 \pm 1/6$ می باشد که این پارامتر نیز در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل نسبت به افراد بارور به طور معنی داری ($p < 0.001$) بالاتر است.

سطح استرس اکسیداتیو با رنگ آمیزی DCF و با استفاده از آنالیز فلوسایتومتری ارزیابی شده است. درصد اسپرم های ROS مثبت در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل و بارور به ترتیب $38/7 \pm 3/6$ و $21/7 \pm 3/6$ بود که در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل نسبت به افراد بارور به طور معنی داری بالاتر بوده ($p < 0.001$)، اما شدت ROS در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل ($35/04 \pm 1/9$) در مقایسه با افراد بارور ($80/92 \pm 7/05$) به طور معنی داری ($p < 0.001$) پایین تر است (نمودار ۲).

مقایسه آسیب DNA، کمبود پروتئامین و استرس اکسیداتیو اسپرم بین افراد بارور و نابارور مبتلا به واریکوسل

درصد آسیب DNA اسپرم با استفاده روش TUNEL ارزیابی شد. درصد اسپرم های دارای آسیب DNA (TUNEL مثبت) در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل و بارور به ترتیب $16/2 \pm 0/9$ و $8/1 \pm 0/7$ است. بنابراین درصد آسیب DNA در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل نسبت به افراد بارور به طور معنی داری ($p < 0.001$) بیشتر می باشد. نتایج بررسی کمبود پروتئامین با استفاده از رنگ آمیزی CMA3 نشان می دهد که درصد اسپرم های CMA3 مثبت در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل و بارور

ارتباط پارامترهای اسپرمی با درصد آسیب DNA کمبود پروتامین، درصد و شدت استرس اکسیداتیو

ارتباط بین پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک، مورفولوژی غیرطبیعی) با درصد آسیب DNA، کمبود پروتامین، درصد و شدت استرس اکسیداتیو در افراد بارور و نابارور مبتلا به واریکوسل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج ارائه شده در جدول ۲ نشان می‌دهد که در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل، بین غلظت اسپرم با درصد و شدت ROS ارتباط مثبت و معنی‌داری وجود دارد ($p < 0.05$). همچنین بین درصد تحرک اسپرم و درصد اسپرم‌های ROS مثبت ارتباط مثبت و معنی‌داری وجود دارد ($p < 0.05$). به‌علاوه ارتباط منفی و معنی‌داری بین درصد تحرک اسپرم با آسیب DNA وجود دارد ($p < 0.01$) (جدول ۲). در افراد بارور فقط بین درصد کمبود پروتامین (اسپرم‌های

CMA3 مثبت) با غلظت و تحرک اسپرم ارتباط منفی و معنی‌داری وجود دارد ($p < 0.01$).

جدول ۳ ارتباط بین میزان آسیب DNA (درصد اسپرم‌های TUNEL مثبت)، کمبود پروتامین (درصد اسپرم‌های CMA3 مثبت)، درصد و شدت ROS را با یکدیگر نشان می‌دهد. در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل، رابطه مثبت و معنی‌داری بین درصد اسپرم‌های ROS مثبت و شدت ROS ($p < 0.01$) وجود دارد. همچنین در این افراد، رابطه معنی‌دار و منفی بین درصد آسیب DNA و درصد ROS مثبت ($p < 0.05$) وجود دارد. به‌علاوه ارتباط معنی‌دار و مثبت بین درصد کمبود پروتامین و شدت ROS در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل مشاهده شد ($p < 0.05$) (جدول ۳).

جدول ۲: ارتباط بین پارامترهای اسپرمی با درصد و شدت ROS، درصد اسپرم‌های TUNEL مثبت و CMA3 مثبت اسپرم در افراد بارور و نابارور واریکوسل.

پارامترها	گروه	غلظت (10^6 میلیون در هر میلی لیتر)	درصد تحرک	درصد مورفولوژی غیر طبیعی اسپرم
درصد اسپرم‌های ROS مثبت	واریکوسل	۰/۴ **	۰/۳ **	- ۰/۰۳
	بارور	۰/۰۳	۰/۱	- ۰/۰۵
شدت ROS	واریکوسل	۰/۲ *	۰/۰۲	۰/۰۱
	بارور	۰/۰۷	- ۰/۳	- ۰/۰۶
درصد اسپرم TUNEL مثبت	واریکوسل	- ۰/۰۹	- ۰/۲ *	۰/۱
	بارور	- ۰/۲	- ۰/۲	۰/۳
درصد اسپرم CMA3 مثبت	واریکوسل	- ۰/۱	- ۰/۱	۰/۰۶
	بارور	- ۰/۴ *	- ۰/۴ *	۰/۲

*** $p < 0.005$ معنی‌دار در نظر گرفته می‌شود. * $p < 0.01$ معنی‌دار در نظر گرفته می‌شود.

جدول ۳: ارتباط بین درصد اسپرم‌های TUNEL مثبت، CMA3 مثبت، درصد و شدت ROS با یکدیگر در افراد نابارور واریکوسل و بارور.

پارامترها	گروه	ROS شدت	درصد اسپرم‌های CMA3 مثبت	درصد اسپرم‌های TUNEL مثبت
درصد اسپرم‌های ROS مثبت	واریکوسل	۰/۲ *	- ۰/۳ **	۰/۰۷
	بارور	- ۰/۳	۰/۰۳	۰/۱
شدت ROS	واریکوسل	-----	۰/۲	۰/۴ **
	بارور	-----	- ۰/۰۴	۰/۱
درصد اسپرم CMA3 مثبت	واریکوسل	۰/۲	-----	۰/۲
	بارور	- ۰/۰۴	-----	۰/۲

*** $p < 0.005$ معنی‌دار در نظر گرفته می‌شود. * $p < 0.01$ معنی‌دار در نظر گرفته می‌شود.

بحث

واریکوسل به اتساع وریدهای شبکه پامپینی فرم طناب اسپرماتیک اطلاق می شود (۳). در دهه های گذشته تا حدودی ارتباط بین ناباروری و واریکوسل مشخص شده، اما تحقیقات اخیر، بیشتر بر اساس مطالعات مولکولی و ژنتیکی می باشد، به این امید که با بررسی های بیشتر در این زمینه افق های جدیدی برای درمان ناباروری در مردان مبتلا به واریکوسل، باز شود. مهم ترین نظریه در مورد تاثیر واریکوسل بر روی عملکرد بیضه، تغییر در کارایی تبادل دما در داخل بیضه و اختلال در فرآیند اسپرماتوژنز می باشد (۳ و ۱۱). یکی از عوامل اختلال در عملکرد اسپرم در افراد مبتلا به واریکوسل، استرس اکسیداتیو ناشی از استرس دمایی در این افراد است (۲۰). تولید بیش از حد ROS باعث آسیب به غشای اسپرم، کاهش تحرک و توانایی اسپرم در اتصال به تخمک شده و همچنین آسیب مستقیم به DNA اسپرم و اثرات غیرمستقیم بر سلامت ژنوم جنین و در نهایت کاهش باروری را به همراه دارد (۲۰ و ۲۱).

نتایج این مطالعه نشان می دهد که در افراد مبتلا به واریکوسل غلظت، تحرک و مورفولوژی طبیعی اسپرم به طور معنی داری نسبت به افراد بارور پایین تر است که با نتایج مطالعات دیگر مطابقت دارد (۲۲ و ۲۳). این نتایج تاکید بیشتری بر این تئوری دارد که افزایش دمای بیضه می تواند منجر به نقص در روند اسپرماتوژنز و در نتیجه مختل شدن تولید و تمایز اسپرم در بیضه ها شود. مطالعات نشان می دهد که در افراد مبتلا به واریکوسل، با افزایش میزان آپوپتوزیس، جمعیت رده های مختلف سلول های زایا، مانند اسپرماتوگونیا، اسپرماتوسیت، اسپرماتید و اسپرم کاهش می یابد. به علاوه، عبور اسپرم های تولید شده از لوله های منی ساز، تحت تاثیر واریکوسل قرار گرفته و در نهایت، باعث کاهش تعداد اسپرم انزالی در این افراد می شود (۲۴-۲۶). از طرفی واریکوسل می تواند با تاثیر بر سلول های سرتولی باعث واکنش شدن و آزاد شدن اسپرم ها قبل از بلوغ کامل شده، که از این طریق باعث حضور اسپرم های نابالغ و دارای مورفولوژی غیر طبیعی در انزال می شود (۲۲). همچنین در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل، افزایش سطح رادیکال های آزاد، باعث پراکسیداسیون اسید های چرب غیر اشباع در ساختار غشای سر اسپرم و قطعه میانی شده و با تغییر در سیالیت غشا، باعث کاهش میزان تحرک اسپرم می شود (۲۷).

اختلال در فرآیند اسپرماتوژنز منجر به تولید اسپرم هایی می شود

که علاوه بر نقص در پارامترهای اسپرمی، سطوح متفاوتی از میزان نقص در ساختار کروماتین و افزایش سطح استرس اکسیداتیو را نشان می دهند. بنابراین در این مطالعه سلامت کروماتین اسپرم و سطح استرس اکسیداتیو نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه، سلامت ژنوم اسپرم با استفاده از روش TUNEL و CMA3 بررسی شد و اختلاف معنی داری در گروه واریکوسل و بارور مشاهده شد، به طوری که میزان آسیب DNA و کمبود پروتامین در افراد مبتلا به واریکوسل در مقایسه با افراد بارور بیشتر است که با نتایج مطالعات دیگران در این زمینه مطابقت دارد. بر طبق نتایج Blumer و همکاران (۲۸)، مردان مبتلا به واریکوسل درصد بالاتری از آسیب DNA در مقایسه با افراد سالم دارند. همچنین Fuse و همکاران (۲۹) گزارش کردند که میزان آسیب DNA، در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل در مقایسه با افراد نابارور بدون واریکوسل و افراد بارور، به طور قابل ملاحظه ای بیشتر است. در تایید موارد فوق می توان بیان کرد که در افراد مبتلا به واریکوسل فاکتورهای مختلفی منجر به آسیب DNA می شود که ممکن است در هر یک از مراحل اسپرماتوژنز رخ دهد. در این رابطه فرضیه های متعددی وجود دارد که به شرح زیر می باشد: ۱) کمبود پروتامین در هسته اسپرم و یا عدم جایگزینی مناسب پروتامین به جای هیستون در مرحله اسپرمیوژنز، DNA را مستعد آسیب می کند. ۲) گونه های فعال اکسیژن می تواند مستقیماً به بازهای DNA اسپرم متصل شده و یا با فعال کردن آپوپتوزیس سبب آسیب DNA شود (۴ و ۱۱). مطالعات مختلف نشان می دهد که چندین روش برای بررسی استرس اکسیداتیو وجود دارد که از آن جمله می توان به اندازه گیری مارکرهای اختصاصی و کلی افزایش ROS (مانند مالون دی آلدئید، پراکسید هیدروژن، نیتریک اکساید و پراکسید هیدروژن) و یا اندازه گیری ظرفیت کل آنتی اکسیدانت های پلاسما (TAC: Total Antioxidant Capacity) (اندازه گیری آنتی اکسیدانت های آنزیمی و غیر آنزیمی) اشاره کرد (۳۰). در این مطالعه، ارزیابی اسپرم های ROS مثبت با استفاده از نشانگر H2DCFDA و آنالیز فلوسایتومتری انجام شد که این نشانگر حساسیت بالایی نسبت به H₂O₂ دارد. نتایج این مطالعه نشان می دهد که درصد اسپرم های ROS مثبت به عنوان شاخص تولید ROS، در گروه واریکوسل نسبت به افراد بارور به طور معنی داری بالاتر است. این نتیجه مطابق با نتایج مطالعات دیگری می باشد که نشان می دهند در مردان نابارور مبتلا به واریکوسل، افزایش سطح استرس اکسیداتیو، نیتریک اکساید و

اسپرم باشد و بیانگر این مسئله است که، اسپرمی که متحرک تر است از تولید ROS بالاتری جهت انجام فرآیند های فیزیولوژیک برخوردار می باشد، به علاوه اسپرم هایی با ROS بیشتر از آسیب DNA کمتری برخوردارند. بنابراین ROS تولید شده احتمالاً در سطح فیزیولوژیک بوده و در صورتی که در سطح غیر فیزیولوژیک بود، احتمالاً ارتباط عکس مشاهده می شود.

همچنین در این مطالعه، در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل، ارتباط مثبت و معنی داری بین کمبود پروتامین و آسیب DNA مشاهده شد. در این رابطه می توان بیان کرد که احتمالاً در این افراد کمبود پروتامین در هسته اسپرم و یا نقص در جایگزینی پروتامین به جای هیستون سبب کاهش تراکم کروماتین شده و در نتیجه DNA اسپرم مستعد آسیب می شود. به عبارت دیگر میزان آسیب DNA در افراد دارای نقص های پروتامین بیشتر است و می توان بیان کرد که کمبود پروتامین منجر به کاهش باندهای دی سولفیدی شده که این امر موجب آسیب پذیرتر شدن DNA می شود (۴). بنابراین می توان به نقش حفاظتی پروتامین در جهت جلوگیری از آسیب به DNA هسته اسپرم اشاره کرد.

در این مطالعه، در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل، ارتباط منفی و معنی داری بین تحرک اسپرم و آسیب DNA وجود دارد. کروماتین هسته اسپرم به وسیله جایگزینی پروتامین ها به جای هیستون کاملاً متراکم شده و باعث ایجاد سر هیدرودینامیک در اسپرم می شود که می تواند در افزایش سرعت حرکت اسپرم نقش داشته باشد. در نتیجه می توان بیان کرد که کاهش تراکم و آسیب DNA، تاثیر منفی بر تحرک اسپرم دارد (۳۵).

در این مطالعه، در افراد بارور، فقط بین درصد کمبود پروتامین (اسپرم های CMA3 مثبت) با غلظت و تحرک اسپرم ارتباط منفی و معنی داری وجود دارد، که نشان دهنده این مسئله است که انجام روند صحیح اسپرماتوژنز و جایگزینی مناسب پروتامین به جای هیستون، باعث تولید تعداد بیشتر اسپرم در بیضه می شود، همچنین روند صحیح جابجایی هیستون با پروتامین منجر به تراکم صحیح کروماتین و در نتیجه تحرک مناسب اسپرم می شود (۱۳).

نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان می دهد که در افراد مبتلا به واریکوسل پارامترهای اسپرمی از جمله غلظت، درصد تحرک اسپرم و

پراکسیداسیون لیپید بیش از افراد نابارور بدون واریکوسل می باشد (۲۱ و ۳۱). همچنین بسیاری از مطالعات بیان کردند که در افراد واریکوسل علاوه بر افزایش سطح استرس اکسیداتیو، میزان آنتی اکسیدانت ها در مایع منی نیز نسبت به افراد بارور کاهش می یابد. بنابراین می توان بیان کرد که احتمالاً کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانتی می تواند باعث افزایش سطح استرس اکسیداتیو و بر هم خوردن تعادل در مایع منی افراد نابارور مبتلا به واریکوسل شود (۳۱ و ۳۲). برای مثال، آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز گلوکاتینون که وظیفه سم زدایی H_2O_2 را بر عهده دارند، حساس به حرارت می باشند که افزایش دمای اسکروتوم می تواند منجر به کاهش فعالیت و یا غیر فعال شدن آن ها شود. در نتیجه کاهش فعالیت آنزیمی ممکن است که توجیهی برای افزایش سطح H_2O_2 مشاهده شده در مایع منی افراد نابارور مبتلا به واریکوسل باشد (۳۳).

در مطالعه حاضر، شدت ROS در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل نسبت به افراد بارور به طور معنی داری پایین تر است. طبق مطالعه ای که Aitken و همکاران (۳۴) بر روی افراد نابارور انجام دادند، اسپرم هایی که ROS مثبت هستند به تدریج به سمت TUNEL مثبت و مرحله آخر آپوپتوزیس پیش می روند و در نتیجه تولید بیش از حد ROS باعث مرگ سلولی شده که در نهایت در این افراد، شدت ROS کاهش می یابد.

در این مطالعه، در افراد مبتلا به واریکوسل، ارتباط مثبت و معنی داری بین شدت ROS با کمبود پروتامین وجود دارد. از مهم ترین عملکردهای پروتامین، حفاظت و حمایت ژنوم اسپرم می باشد، که نقص در جایگزین شدن پروتامین به جای هیستون، می تواند ژنوم را نسبت به عوامل آندوژن و آگزوژن نظیر نوکلئازها، موتاژنها و رادیکال های آزاد آسیب پذیر نماید و در نتیجه باعث افزایش شدت استرس اکسیداتیو شود (۱۰).

در این مطالعه، در افراد مبتلا به واریکوسل، ارتباط مثبت و معنی داری بین درصد اسپرم های ROS مثبت و درصد تحرک اسپرم وجود دارد، همچنین ارتباط منفی و معنی داری بین درصد اسپرم های ROS مثبت با آسیب DNA وجود دارد. بر اساس تئوری پیشنهاد شده در مقالات قبلی، اسپرم متحرک، توانایی تولید ROS تا سطح فیزیولوژیک، جهت انجام عملکردهای فیزیولوژیک مانند فرآیند ظرفیت یابی، تحرک های پیراکتیو و واکنش آکروزومی را دارد (۷ و ۳۴). بنابراین رابطه به دست آمده از نتایج این مطالعه، می تواند نشان دهنده حالت فیزیولوژیک خود

human reproduction. *Fertil Steril*. 2003; 79(4):829-843.

11. Shiraishi K, Matsuyama H, Takihara H. Pathophysiology of varicocele in male infertility in the era of assisted reproductive technology. *Int J Urol*. 2012; 19(6): 538-550.

12. Zini A, Dohle G. Are varicoceles associated with increased deoxyribonucleic acid fragmentation? *Fertil Steril*. 2011; 96(6): 1283-1287.

13. Azadi L, Abbasi H, Deemeh MR, Tavalae M, et al. Zaditen (Ketotifen), as mast cell blocker, improves sperm quality, chromatin integrity and pregnancy rate after varicocelectomy. *Int J Androl*. 2010; 34(5): 446-452.

14. Nasr-Esfahani MH, Abasi H, Razavi S, Ashrafi S, et al. Varicocelectomy: semen parameters and protamine deficiency. *Int J Androl*. 2009; 32(2):115-122.

15. Onozawa M, Endo F, Suetomi T, Takeshima H, et al. Clinical study of varicocele: statistical analysis and the results of long-term follow-up. *Int J Urol*. 2002; 9(8): 455-461.

16. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen - 5th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2010; 1-271. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. ISBN 9789241547789.

17. Kheirollahi-Kouhestani M, Razavi S, Tavalae M, Deemeh MR, et al. Selection of sperm based on combined density gradient and Zeta method may improve ICSI outcome. *Hum Reprod*. 2009; 24(10): 2409-2416.

18. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M. Relation between different human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet*. 2001; 18(4): 219-225.

19. Kiani-Esfahani A, Tavalae M, Deemeh MR, Hamiditabar M, et al. DHR123: an alternative probe for assessment of ROS in human spermatozoa. *Syst Biol Reprod*. 2012; 58(3): 168-174.

20. Agarwal A, Hamada A, Esteves SC. Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 1. *Nat Rev Urol*. 2012; 9(12): 678-690.

21. Blumer CG, Restelli AE, Giudice PT, Soler TB, et al. Effect of varicocele on sperm function and semen oxidative stress. *BJU Int*. 2012; 109(2):259-265.

22. Villanueva-Diaz CA, Vega-Hernandez EA, Diaz-Perez MA, Echavarria-Sanchez M, et al. Sperm dysfunction in subfertile patients with varicocele and

مورفولوژی طبیعی نسبت به افراد بارور پائین تر می‌باشد. همچنین میزان آسیب DNA، کمبود پروتامین و سطح استرس اکسیداتیو نسبت به افراد بارور بالاتر است. افزایش دما و اختلال در روند اسپرماتوژنز، استرس اکسیداتیو و آسیب DNA ناشی از استرس، از عوامل عمده کاهش کیفیت مایع منی در این افراد است که در نهایت می‌تواند موفقیت در باروری را تحت تاثیر قرار دهد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین پژوهشکده رویان اصفهان ابراز می‌دارند.

منابع

1. Chemes HE, Rawe VY. The making of abnormal spermatozoa: cellular and molecular mechanisms underlying pathological spermiogenesis. *Cell Tissue Res*. 2010; 341(3): 349-357.

2. Redmon JB, Carey P, Pryor JL. Varicocele- the most common cause of male factor infertility? *Hum Reprod Update*. 2002; 8(1):53-58.

3. Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. Pathophysiology of varicocele in male infertility. *Hum Reprod Update*. 2001; 7(5):473-481.

4. Tavalae M, Razavi S, Nasr-Esfahani MH. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril*. 2009; 91(4): 1119-1126.

5. Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, et al. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod*. 2004; 19 (1):129-138.

6. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. New York: Oxford University Press; 1999: 617-783.

7. Griveau JF, Le Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl*. 1997; 20(2): 61-69.

8. Henkel RR. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian J Androl*. 2011; 13(1): 43-52.

9. Yamanaka K, Fujisawa M, Tanaka H, Okada H, et al. Significance of human testicular mast cells and their subtypes in male infertility. *Hum Reprod*. 2000; 15(7): 1543-1547.

10. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of

- marginal semen analysis. *Andrologia*. 1999; 31(5):263-267.
23. NavaeianKalat E, Tavalae M, Abasi H, Nasr Esfahani MH. Comparison of sperm parameters and DNA integrity between fertile and varicocele individuals. *Journal of Cell*. 2012; 3(2): 171-177.
24. Wu GJ, Chang FW, Lee SS, Cheng YY, et al. Apoptosis-related phenotype of ejaculated spermatozoa in patients with varicocele. *Fertil Steril*. 2009; 91(3): 831-837.
25. Mann SL, Patton WC, King A, Chan PJ. Comparative genomic hybridization analysis of sperm DNA apoptosis after exposure to heat shock. *J Assist Reprod Genet*. 2002; 19(4): 195-200.
26. Hikim AP, Wang C, Lue Y, Johnson L, et al. Spontaneous germ cell apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 Jan; 83(1): 152-156.
27. Kemal Duru N, Morshedi M, Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril*. 2000; 74(6): 1200-1207.
28. Blumer CG, Fariello RM, Restelli AE, Spaine DM, et al. Sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele. *Fertil Steril*. 2008; 90(5): 1716-1722.
29. Fuse H, Akashi T, Mizuno I, Nozaki T, et al. Post-operative changes of sperm chromatin heterogeneity, using acridine orange staining, in varicocele patients. *Arch Androl*. 2006; 52(3): 223-226.
30. Sakamoto Y, Ishikawa T, Kondo Y, Yamaguchi K, et al. The assessment of oxidative stress in infertile patients with varicocele. *BJU Int*. 2008; 101(12): 1547-1552.
31. Pasqualotto FF, Sundaram A, Sharma RK, Borges E Jr, et al. Semen quality and oxidative stress scores in fertile and infertile patients with varicocele. *Fertil Steril*. 2008; 89(3): 602-607.
32. Mostafa T, Anis T, Imam H, El-Nashar AR, et al. Seminal reactive oxygen species-antioxidant relationship in fertile males with and without varicocele. *Andrologia*. 2009; 41(2): 125-129.
33. Mostafa T, Anis TH, El-Nashar A, Imam H, et al. Varicolectomy reduces reactive oxygen species levels and increases antioxidant activity of seminal plasma from infertile men with varicocele. *Int J Androl*. 2001. 24(5): 261-265.
34. Aitken RJ, De Iuliis GN, Finnie JM, Hedges A, et al. Analysis of the relationships between oxidative stresses, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Hum Reprod*. 2010; 25(10): 2415-2426.
35. Plastira K, Msaouel P, Angelopoulou R, Zanioti K, et al. The effects of age on DNA fragmentation, chromatin packaging and conventional semen parameters in spermatozoa of oligoasthenoteratozoospermic patients. *J Assist Reprod Genet*. 2007; 24(10): 437-443.

Comparison of Sperm Parameters and its Functional Characteristics Between Fertile and Infertile Men with Varicocele

Barekat F, M.Sc.¹, Tavalae M, M.Sc.^{1*}, Azadi L, M.Sc.¹, Nasr-Esfahani MH, Ph.D.^{1,2}

1. Department of Reproductive Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran

2. Isfahan Fertility and Infertility Center, Isfahan, Iran

* Email corresponding author: Tavalae.royan@gmail.Com

Received: 7 Mar. 2015

Accepted: 19 Mar. 2015

Abstract

Aim: The aim of this study is to compare sperm parameters (concentration, motility and morphology), DNA damage, percentage and intensity of ROS (Reactive Oxygen Species) and relationship between these parameters in the fertile and infertile men with varicocele.

Material and Methods: In this study, the semen samples from 83 individuals with varicocele and 32 fertile men were studied. Sperm parameters according WHO (World Health Organization) guidelines, protamine deficiency (chromomycin A3 staining), sperm DNA damage (TUNEL assay), percentage and intensity of ROS (DCFH-DA staining) were assessed in fertile and infertile men with varicocele.

Results: The results of this study showed that sperm concentration, percentage of motility and normal morphology were significantly lower in individuals with varicocele compared to fertile individuals. In addition, percentage of sperm DNA damage, protamine deficiency and ROS positive were significantly higher in infertile men with varicocele.

Conclusion: The increase of stress oxidative and testicular temperature in infertile men with varicocele, lead to decrease the quality of sperm parameters as well as negative effects on sperm chromatin integrity. Therefore the process of spermatogenesis and the rate of fertility were affected in these individuals.

Keywords: Varicocele, DNA fragmentation, Sperm parameters, Stress oxidative